

鱼类 I 型与 II 型胶原蛋白基因系统进化及其在有/无肌间骨代表鱼中的表达比较分析

廖青 万世明 王旭东 高泽霞

PHYLOGENY AND COMPARATIVE EXPRESSION ANALYSIS OF TYPE I AND TYPE II COLLAGEN GENES IN THE REPRESENTATIVE FISH SPECIES WITH AND WITHOUT INTERMUSCULAR BONES

LIAO Qing, WAN Shi-Ming, WANG Xu-Dong, GAO Ze-Xia

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.087>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

不同鱼类肌间骨的骨化模式研究

OSSIFICATION PATTERNS OF INTERMUSCULAR BONES IN DIFFERENT FISH SPECIES

水生生物学报. 2018, 42(1): 131–137 <https://doi.org/10.7541/2018.017>

禾花鲤与建鲤肌间骨miRNAs测序与分析比较

MIRNAS SEQUENCING AND ANALYSIS OF INTERMUSCULAR BONE BETWEEN RICE FLOWER CARP AND JIAN CARP

水生生物学报. 2019, 43(4): 757–762 <https://doi.org/10.7541/2019.089>

异育银鲫A⁺系和F系肌间骨的比较分析

COMPARATIVE ANALYSIS OF INTERMUSCULAR BONES BETWEEN CLONE A⁺ AND CLONE F STRAINS OF ALLOGYNOGENETIC GIBEL CARP

水生生物学报. 2017, 41(4): 860–869 <https://doi.org/10.7541/2017.107>

刀鲚肌间骨新类型的发现

THE IDENTIFICATION OF NEW TYPES OF INTERMUSCULAR BONES IN *COILIA NASUS*

水生生物学报. 2020, 44(1): 104–111 <https://doi.org/10.7541/2020.013>

团头鲂MSTN基因cDNA结构、表达及过表达对胚胎发育的影响

MOLECULAR STRUCTURE AND EXPRESSION OF MYOSTATIN IN *MEGALOBrama AMBLYCEPHALA* AND ITS OVEREXPRESSION EFFECTS IN EMBRYO

水生生物学报. 2017, 41(3): 573–580 <https://doi.org/10.7541/2017.74>

团头鲂nanos3基因的克隆鉴定

MOLECULAR CLONING AND IDENTIFICATION OF NANOS3 IN BLUNT SNOUT BREEM (*MEGALOBrama AMBLYCEPHALA*)

水生生物学报. 2019, 43(3): 457–464 <https://doi.org/10.7541/2019.056>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.087

鱼类 I 型与 II 型胶原蛋白基因系统进化及其在有/无 肌间骨代表鱼中的表达比较分析

廖青^{1,2} 万世明^{1,2} 王旭东^{1,2} 高泽霞^{1,2,3}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;
2. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 武汉 430070; 3. 湖北省名优鱼育种与
健康养殖工程技术研究中心, 武汉 430070)

摘要: 研究在分析鱼类 I 型与 II 型胶原蛋白基因系统进化基础上, 以有肌间骨的团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和无肌间骨的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为研究对象, 探究了 I 型与 II 型胶原蛋白基因在二者不同发育阶段及不同部位肌肉组织中的表达模式。系统进化分析结果显示, 胶原蛋白基因*colla1*、*colla2*和*col2a1*在有刺鱼和无刺鱼中均各自聚为一支, 团头鲂和罗非鱼3个基因的氨基酸同源性都在90%以下。不同部位肌肉组织(背部上方、尾部上方和尾部下方)的基因表达结果显示, 团头鲂*colla1a*和*colla1b*基因与罗非鱼该同源基因*colla1*在不同肌肉组织中的表达模式存在明显差异。在团头鲂中, I 型与 II 型胶原蛋白基因在背上肌肉中的表达量高于尾部; 而在罗非鱼中, 其表达模式则相反。团头鲂和罗非鱼不同发育时期的基因定量结果显示: 团头鲂*colla1a*和*col2a1b*基因的表达在肌间骨出现以前(15 dph)和基本出现之后(50 dph)显著($P < 0.01$)增加, 且 I 型胶原蛋白基因和*col2a1b*的相对表达量在不同时期差异明显, 其中*colla1a*基因在50 dph的表达丰度极高; 与团头鲂相比, 罗非鱼中相应基因的表达量变化较小, 整体波动不大。研究揭示了 I 型和 II 型胶原蛋白在有刺鱼与无刺鱼肌肉中的表达模式, 结果表明*colla1*在团头鲂和尼罗罗非鱼两种鱼类中表达模式显著不同($P < 0.01$), 推测其与肌间骨发育潜在相关。

关键词: 肌间骨; 团头鲂; 罗非鱼; 胶原蛋白基因; 基因进化; 表达分析

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)02-0318-09



肌间骨(Intermuscular Bone, IB), 俗称肌间刺、鱼刺, 是由鱼类肌膈结缔组织连续同源骨化而来的膜骨^[1], 根据自身直接或间接附着的位置可分为椎体小骨、髓弓小骨和脉弓小骨三种类型^[2, 3]。肌间骨仅存在于低等真骨鱼类中, 在系统演化过程中表现出数目由少到多, 由多到少再到无的特征^[3-5]。鱼类肌间骨相关研究早在20世纪60年代便已开展^[6], 但多数研究集中在肌间骨发育及形态方面。近年来, 研究人员逐步开展了肌间骨发生发育分子调控机制方面的研究。Wan等^[7]通过构建团头鲂肌间骨mRNA与miRNA组学数据库, 揭示了大量肌间骨发

育的潜在调控基因^[8, 9]及其数目相关的SNP分子标记。陈宇龙等^[10]发现*tnmd*基因对肌间骨的形成具有一定调控作用, Nie等^[11]研究发现肌间骨的骨化类型为膜内骨化, Zhang等^[12]发现骨形态发生蛋白(BMPs)家族基因对肌间骨的发育具有潜在调控作用。但总体来讲, 基因与肌间骨发生发育的关联性研究还非常缺乏。

胶原蛋白(Collagen)家族成员众多, 功能多样。其中, I 型胶原蛋白(Collagen type I, COL I)是骨细胞外基质的主要成分, 由*colla1*和*colla2*基因编码。II 型胶原多分布于骨骼和关节等组织, 由

收稿日期: 2020-04-27; 修订日期: 2020-09-06

基金项目: 国家自然科学基金(31872559); 国家重点研发计划蓝色粮仓创新专项(2018YFD0900102); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-46-08); 中央高校基本科研业务费专项(2662018PY035)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872559); the National Key Research and Development Program (2018YFD0900102); Modern Agriculture Industry Technology System Construction Projects of China (CARS-46-08); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662018PY035)]

作者简介: 廖青(1995—), 女, 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 616944841@qq.com

通信作者: 高泽霞(1982—), 女, 博士, 教授; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

col2a1 基因编码。哺乳动物中相关研究表明 I 型和 II 型胶原参与骨骼的矿化和生长过程^[13-16]。在鱼类中, 胶原蛋白基因在骨骼发育中的表达调控作用也已被报道, 如 *colla1* 在骨骼畸形的金头鲷 (*Sparus aurata*) 中表达下调^[17], *col10a1* 的表达在青鳉 (*Oryzias latipes*) 中标志着成骨细胞的早期阶段^[18]等; Gistelinc 等^[19]以斑马鱼为模型研究了大量 I 型胶原突变体的骨骼表型, 包括愈合组织形成和肋骨弯曲等。但截至目前, 胶原蛋白在肌间骨发生发育过程中的表达调控作用还未知。

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae), 鲃亚科 (Culterinae), 鲃属 (*Megalobrama*), 是我国特有的重要草食性经济鱼类之一^[20]。团头鲂包含轴上肌中的髓弓小骨和尾部轴下肌中的脉弓小骨两种肌间骨, 其成年个体的肌间骨形态较为复杂。孵出后 20d 左右, 团头鲂幼鱼出现第一根肌间骨; 孵出后 40d 左右肌间骨基本完全出现; 之后随着鱼体的生长, 肌间骨的形态不断分化复杂^[21]。尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 生长速度快, 肉质鲜美, 是世界上仅次于鲤的主要养殖鱼类, 也是我国主要养殖鱼类之一^[22]。罗非鱼背部和尾部肌肉中均无肌间骨的存在^[23], 即罗非鱼无髓弓小骨和脉弓小骨。因此, 这两种鱼类可作为探究鱼类肌间骨发生发育分子机制的比较模型。为探究胶原蛋白基因表达模式与鱼类肌间骨发育的相关性, 本研究以有肌间骨的团头鲂和无肌间骨的尼罗罗非鱼为研究对象, 探究有刺鱼和无刺鱼 I 型与 II 型胶原蛋白基因的系统进化特征, 并进一步分析了 I 型与 II 型胶原蛋白基因在个体不同发育阶段以及不同部位肌肉组织中的表达模式, 为发掘硬骨鱼类肌间骨形成的潜在分子调控提供了理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用团头鲂 1 龄样本和出膜幼苗均来自湖北百容良种有限公司; 尼罗罗非鱼 1 龄样本购自海南水产品市场, 出膜幼苗由广东海大集团友情提供。为测定 I、II 型胶原蛋白在不同组织中的转录水平, 随机抽取 3 尾 1 龄团头鲂 [平均体重 (143.23 ± 53.77) g], 3 尾 1 龄尼罗罗非鱼 [平均体重 (775.23 ± 26.88) g], 用 MS-222 麻醉后解剖, 每个标本采集背上肌、尾上肌和尾下肌组织样品 (包含肌间骨)。对于 5—60 dph (Days post hatching, dph) 的团头鲂和尼罗罗非鱼幼鱼, 使用 MS-222 麻醉后, 采集尾部肌肉, 采样周期为 5d。所有组织在采样后立即用液氮冷

冻, 然后转入 -80℃ 冰箱保存待用。

1.2 Total RNA 提取及 cDNA 合成

用 Trizol 法 (TaKaRa, 大连) 从 -80℃ 冻存的肌肉样品中提取 Total RNA, 并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。使用 NanoDrop ND-2000 核酸蛋白仪 (Thermo, 美国) 测定 RNA 浓度及质量。参照 HiScript II Q Select RT SuperMix (Vazyme Biotech Co., Ltd., Nanjing, China) 试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA 后, 于 -80℃ 冻存备用。

1.3 I 型与 II 型胶原蛋白基因的克隆

Ensembl 上下载斑马鱼 *colla1a* (ENS DART000000009393.6)、*colla1b* (ENS DART000000015092.9)、*colla2* (ENS DART000000042990.4) 和 *col2a1b* (ENS DART000000047844) 的 cDNA 序列, 与课题组之前已获得的团头鲂尾部肌肉转录组序列^[24] 进行 blast 比对, 获得团头鲂 *colla1a* (MN580510)、*colla1b* (MN580511) 和 *colla2* (MN580512) 的完整 CDS 序列和 *col2a1b* 基因的部分 CDS 序列。利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 送北京擎科生物科技有限公司武汉分公司合成 (表 1), 以转录的 cDNA 为模板进

表 1 团头鲂 *col2a1b* 基因克隆相关引物信息

Tab. 1 Primers used for *col2a1b* gene clone

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'—3')	退火温度 T_m (°C)	产物长度 Product size (bp)
<i>col2a1b</i> 引物 1 <i>col2a1b</i> primer 1	AGGCAACCCTGG AGAAGC TAGCACCATCGAG ACCTGAATA	59	224
<i>col2a1b</i> 引物 2 <i>col2a1b</i> primer 2	CCTTTGAACCCTG CGAGAC GAGATGATGGCG AACCTGG	58	646
<i>col2a1b</i> 引物 3 <i>col2a1b</i> primer 3	TCTGGTAACCCTG GTACTGATG CCGACTTTGCCCT GTGGA	61	509
<i>col2a1b</i> 引物 4 <i>col2a1b</i> primer 4	CGGGTCTCGCAGG GTTCAA TCCAGCCTTCCCA GCCTCAC	58	482
<i>col2a1b</i> 引物 5 <i>col2a1b</i> primer 5	CCTCGGTCACCAG GAACAC CGGTCCACAGGG CAAGT	54	732
<i>col2a1b</i> 引物 6 <i>col2a1b</i> primer 6	GGGAAAGACGGC GCAAGA ACCCACGCAACCC AGCAT	60	508
<i>col2a1b</i> 引物 7 <i>col2a1b</i> primer 7	CCAGAAGGTCCA GAAGCAC GGAGCCGCAGGT AGAGTT	49	776
<i>col2a1b</i> 引物 8 <i>col2a1b</i> primer 8	ACAATGGGTAGG CGTGATG CTGCTGGAGCTCG GGGAAT	61	1073
<i>col2a1b</i> 引物 9 <i>col2a1b</i> primer 9	TGGCACCTAATAC AGCAA ACAAGAAACAGA CGGCAC	56	366

行PCR扩增。用1%琼脂糖检测产物质量后,将条带单一的PCR产物送往武汉擎科生物技术有限公司测序。将测序获得的目的基因片段与已知片段比对拼接,获得团头鲂*col2a1b*(MN580514)的完整CDS序列。尼罗罗非鱼*colla1*(ENSONIT00000008027.1)、*colla2*(ENSONIT00000013579.1)和*col2a1b*(ENSONIT00000006473.1)的CDS序列直接从Ensembl数据库下载获得。

1.4 I型与II型胶原蛋白基因的同源性分析

使用NCBI ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)在线预测基因开放阅读框,使用ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析I型与II型胶原蛋白的理化性质。用DNAMAN软件比较尼罗罗非鱼和团头鲂*colla1(a/b)*、*colla2*、*col2a1b*基因的相似度。使用NCBI BLAST查找并下载与目的基因同源性较高的序列,使用MEGA7.0软件构建系统进化树。

1.5 I型与II型胶原蛋白基因定量表达分析

参照已获得的I、II型胶原蛋白基因的序列信息,以 β -actin为内参基因,设计定量引物(表2),送武汉擎科生物技术有限公司合成。以团头鲂和尼罗罗非鱼不同发育时期样品和1龄鱼不同组织样品cDNA为模板,参照试剂盒Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix (Low Rox Plus)(翊圣,上海)说明进行qRT-PCR反应。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行转录本相对

表达水平计算。使用SPSS软件及Duncan's Multiple Range Test来比较基因在幼鱼不同发育时期及不同组织中的相对表达水平。

2 结果

2.1 基因克隆及基因理化性质分析

基于序列同源性,使用斑马鱼和草鱼基因序列克隆拼接了团头鲂I型与II型胶原蛋白序列,并在线验证开放阅读框的完整性。最终获得团头鲂I型胶原蛋白*colla1a*、*colla1b*、*colla2*及II型胶原蛋白*col2a1b*的核心序列。其CDS序列长度依次为4347、4353、4059和3741 bp,分别编码1448、1450、1352和1246个氨基酸。使用ProtParam软件对基因进行理化性质分析(表3)。

2.2 基因同源性分析

使用DNAMAN对人(*Homo sapiens*)、鼠(*Mus musculus*)、鸡(*Gallus gallus*)、猪(*Sus scrofa*)、羊(*Ovis aries*)、团头鲂(*M. amblycephala*)及其他鱼类的I、II型胶原蛋白基因的氨基酸序列进行比较,并使用MEGA 7.0软件构建系统进化树。结果显示,团头鲂与斑马鱼4个基因的氨基酸相似度分别达到了94.23%(*colla1a*)、90.46%(*colla1b*)、93.32%(*colla2*)和84.77%(*col2a1b*),序列同源性较高(图1)。团头鲂和尼罗罗非鱼基因的氨基酸比对结果显示:团头鲂*colla1a*、*colla1b*和尼罗罗非鱼*colla1*三个基因的氨基酸相似度为83.39%,团头鲂*colla1a*较尼罗罗非鱼*colla1*的序列插入了157个氨基酸,团头鲂*colla1b*较尼罗罗非鱼*colla1*的序列插入了159个氨基酸;团头鲂与尼罗罗非鱼的*colla2*的氨基酸序列相似度为67.38%,团头鲂较尼罗罗非鱼的*colla2*序列插入了272个氨基酸;团头鲂与尼罗罗非鱼*col2a1b*的序列相似度为74.8%,团头鲂较尼罗罗非鱼存在245个氨基酸的缺失(图1)。I型和II型胶原的系统进化树显示鱼类与哺乳类和家禽类的遗传距离比较远,形成2个大分支。在鱼类大分支中,针对有无髓弓小骨和脉弓小骨,4个基因的系统进化分析都显示团头鲂、草鱼和斑马鱼等有刺鱼聚在一支,而尼罗罗非鱼、半滑舌鲷和青鳉等无刺鱼聚在一支(图2)。

2.3 基因在不同组织的差异表达分析

以1龄团头鲂和1龄尼罗罗非鱼为材料,采用qRT-PCR方法分析*colla1(a/b)*、*colla2*和*col2a1b*在躯体不同部位肌肉组织中的表达情况,结果显示:I型胶原蛋白(*colla1*和*colla2*)在团头鲂背部、尾部上方及尾部下方中的表达量依次下降,在罗非鱼中则呈先上升后下降趋势(图3A和3B)。团头鲂

表2 基因qRT-PCR相关引物信息

Tab. 2 Primes used for qRT-PCR

引物名称Primer name	引物序列Primer sequence (5'—3')
团头鲂 β -actin	CGTGCTGTTTCCCTTCCATT CAATACCGTGCTCAAAGGATACTT
团头鲂 <i>colla1a</i>	CAGCCGCTTCACATACAG GCCAACTTCAATGCCAAA
团头鲂 <i>colla1b</i>	TGCGCCTGATGTCCAACCAA CGTCCTCGCTGACTCTGTATGTG
团头鲂 <i>colla2</i>	TTGATGGACGCAAAGGAG CAGAAGGGCCAACACGAC
团头鲂 <i>col2a1b</i>	CTGAAACTCTGCCACCCA CCTTGTTAGTCCACCAGTTCTT
尼罗罗非鱼 β -actin	CCCACCTGAGCGTAAATA CCTGAGTTGTGTATGAGAAATG
尼罗罗非鱼 <i>colla1</i>	GAAGCACGTCTGGTTCGG GTGGTAGGTAATGTTCTGGGAT
尼罗罗非鱼 <i>colla2</i>	AGAGCGGCAGCCTGAAGA GGAGGCGAGATGGTTTATTT
尼罗罗非鱼 <i>col2a1b</i>	GTCTGCCTTCGCTGGTCT GCTGCGGATGTTCTCAAT

*coll1a*的表达水平显著高于*coll1b*, *coll1a*在团头鲂背部、尾部上方及尾部下方肌肉中的表达量依次显著降低($P<0.01$), *coll1b*的表达则无显著性差异($P>0.05$)。罗非鱼*coll1a*在尾上侧肌肉中的表达量高于背侧肌肉中的表达量, 但二者无显著性差异($P>0.05$)。团头鲂与罗非鱼*coll2*基因的表达模式与*coll1a*类似, 两种鱼类*coll2*在背上肌肉与尾上侧肌肉中的表达量高低相反, 而在尾部上方与尾部下方肌肉中的表达量均显著性($P<0.01$)下降。此外, 表达分析结果表明*col2a1b*在团头鲂背部、尾部上方及尾部下方肌肉中的表达量依次降低, 在罗非鱼相应部位的表达量则依次升高(图 3C)。团头鲂尾部上方与尾部下方肌肉中*col2a1b*的表达无显著差异($P>0.05$), 背部肌肉中的高表达量与尾部肌肉

中的低表达量有极显著差异($P<0.01$); 而罗非鱼*col2a1b*在三个部位的肌肉中的表达依次显著升高($P<0.05$)。此外, 结果还表明 I 型胶原蛋白基因在团头鲂(*coll1a*和*coll1b*)各部位肌肉组织中的表达量波动幅度都高于罗非鱼(*coll1a*, 图 3A)。

2.4 胶原蛋白基因在不同发育阶段的表达分析

本研究采用qRT-PCR方法分析了目标基因在团头鲂和尼罗罗非鱼5—60 dph的表达变化。如图 4 所示, 团头鲂*coll1a*从5—15 dph的表达呈上升趋势, 在20—40 dph表达量降至极低且无显著差异($P>0.05$), 而在50 dph左右表达量又出现极显著($P<0.01$)上升, 60 dph时表达量降低但仍在较高水平; *coll1b*基因在各阶段的表达水平相对较低且较为稳定, 各阶段之间无显著差异($P>0.05$), *coll1b*

表 3 团头鲂 I 型和 II 型胶原蛋白基因的理化性质
Tab. 3 Physicochemical properties of type I and type II collagen genes in *M. amblycephala*

指标Index	<i>coll1a</i>	<i>coll1b</i>	<i>coll2</i>	<i>col2a1b</i>
分子式Formula	C ₅₈₅₈ H ₉₁₃₇ N ₁₈₀₅ O ₁₉₃₄ S ₄₄	C ₅₈₃₁ H ₉₀₈₉ N ₁₈₀₃ O ₁₉₂₄ S ₄₅	C ₅₄₄₀ H ₈₅₁₆ N ₁₇₃₂ O ₁₇₆₇ S ₂₆	C ₅₀₂₄ H ₇₈₆₄ N ₁₅₈₆ O ₁₆₅₉ S ₂₀
分子质量Molecular weight	137.21 ku	136.68 ku	127.29 ku	117.67 ku
CDS序列长度Length of CDS sequence	4347 bp	4353 bp	4059 bp	3741 bp
氨基酸数量Number of amino acids	1448	1450	1352	1246
带正电荷的氨基酸残基Total number of positively charged residues, Arg+Lys	127	121	121	118
带负电荷的氨基酸残基Total number of negatively charged residues, Asp+Glu	143	139	102	114
等电点Theoretical pI	5.44	5.31	9.37	8.38
不稳定指数Instability index II	24.27	26.42	24.67	22.48
脂肪指数Aliphatic index	36.02	37.55	39.79	37.09
亲水性平均系数Grand average of hydropathicity	-0.75	-0.732	-0.749	-0.843

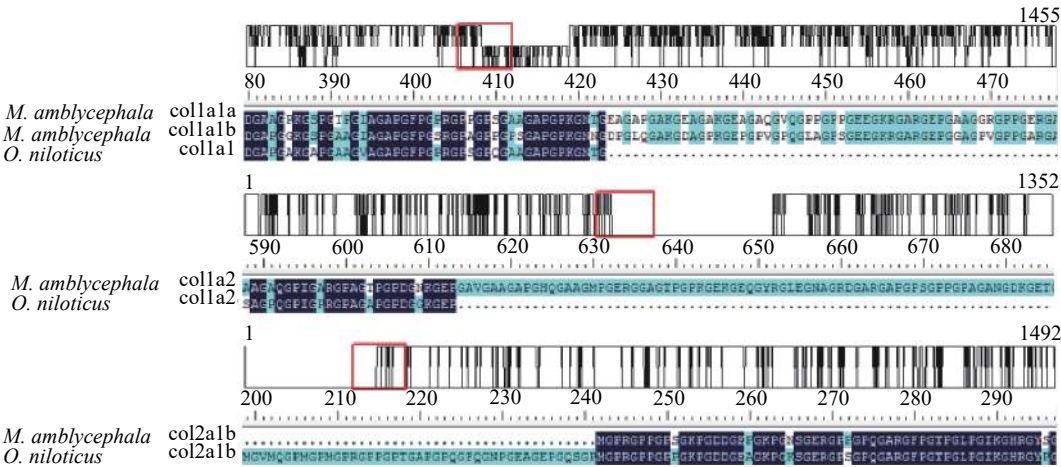


图 1 团头鲂与尼罗罗非鱼 I 型与 II 型胶原蛋白基因氨基酸序列比较

Fig. 1 Comparison of amino acids of type I and type II collagen genes in *M. amblycephala* and *O. niloticus*

方框所示区域可见氨基酸的缺失

Amino acid deletion can be seen in the area indicated by the box

在15、50及60 dph的表达量显著低于*coll1a1*($P < 0.01$)。尼罗罗非鱼*coll1a1*的表达呈先上升后下降

再回升的趋势,从15 dph左右开始极显著($P < 0.01$)上升,在30 dph左右达到峰值,40 dph左右表达量开

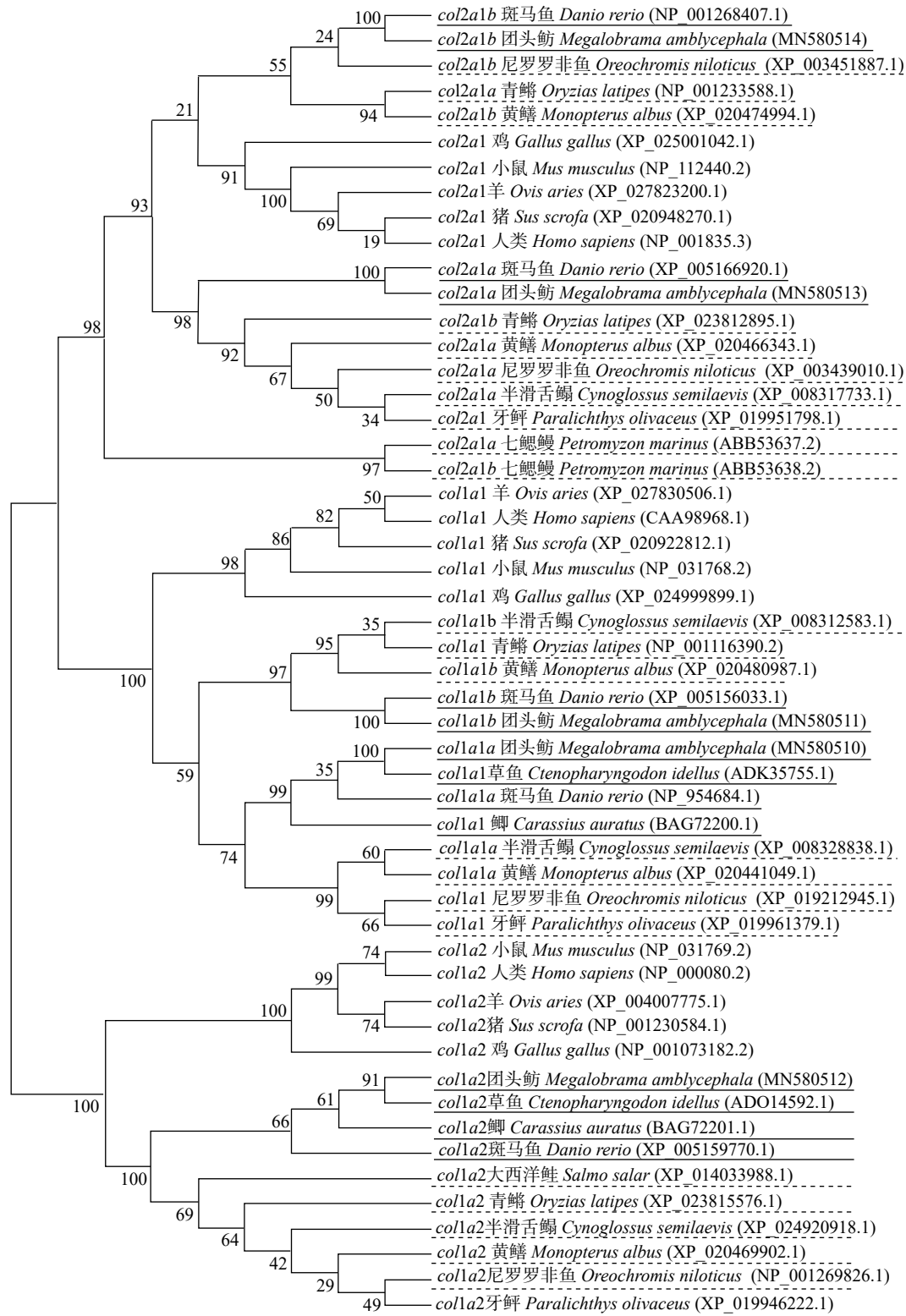


图2 I型和II型胶原蛋白基因系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of type I and type II collagen genes

直线下划线标注含有肌间骨(髓弓小骨和脉弓小骨)的鱼类,虚线下划线标注不含肌间骨(髓弓小骨和脉弓小骨)的鱼类

Solid line indicates fish with intermuscular bones (epineurals and epipleurals); dotted line indicates fish without intermuscular bones (epineurals and epipleurals)

始逐渐降低, 60 dph时表达水平又开始回升。在尼罗罗非鱼10—60 dph的发育过程中, 连续的每2个阶段间均有极显著差异($P<0.01$)。团头鲂*colla1a*基因在15、50和60 dph的表达都比罗非鱼*colla1*基因在对应时期的表达更为活跃。团头鲂的*colla1a*在15、50及60 dph表达丰度极高, 表达量为相邻阶段的数十倍, 与其余各阶段均有极显著差异($P<0.01$); 尼罗罗非鱼的*colla1*在15和60 dph左右表达上升, 变化幅度较小, 但与相邻阶段依然有极显著差异($P<0.01$)。

团头鲂和尼罗罗非鱼不同生长阶段的*colla2*在尾部肌肉中的表达模式非常相似, 整体呈先上升后下降, 再回升的趋势(图5)。团头鲂*colla2*的表达在5—30 dph呈逐渐上升趋势, 到30 dph左右极显著

($P<0.01$)上升到达峰值, 30—60 dph的表达为先下降后上升再下降的过程, 相邻阶段间的变化均有极显著($P<0.01$)差异。尼罗罗非鱼在5—30 dph呈上升趋势, 从15 dph开始极显著($P<0.01$)上升, 到25 dph左右表达水平达到最高, 25与30 dph的表达无显著差异($P>0.05$); 30—60 dph的表达为先下降后上升的过程, 相邻阶段间的变化均有极显著($P<0.01$)差异。此外, *colla2*基因在团头鲂多个阶段的表达都比罗非鱼对应阶段更加活跃。

如图6所示, 团头鲂在尾部肌肉不同发育阶段的表达呈现了2次上升和下降的过程, 相邻两阶段间均有极显著差异($P<0.01$); 尼罗罗非鱼的表达仅呈现一次先上升后下降的过程, 在5—15 dph的表达无显著性差异($P>0.05$)。团头鲂*col2a1b*表达水平

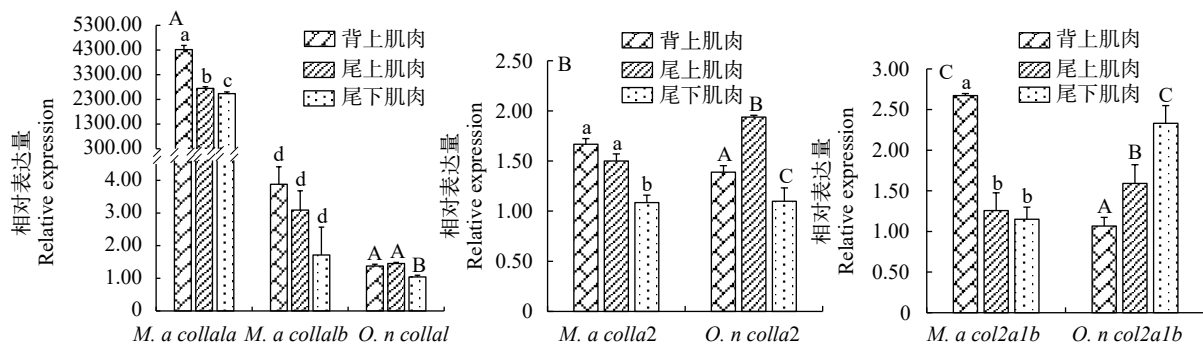


图3 *colla1*(A)、*colla2*(B)和*col2a1b*(C)在团头鲂和罗非鱼不同肌肉组织中的表达

Fig. 3 Expression of *colla1* (A), *colla2* (B) and *col2a1b* (C) in the different tissues of *M. amblycephala* (M. a) and *O. niloticus* (O. n)

不同的小写字母和大写字母分别表示团头鲂和罗非鱼不同组织之间的显著性差异($P<0.05$); 下同

Different uppercase and lowercase letters indicate the significant differences for *M. amblycephala* and *O. niloticus* in different tissues, respectively ($P<0.05$). The same applies below

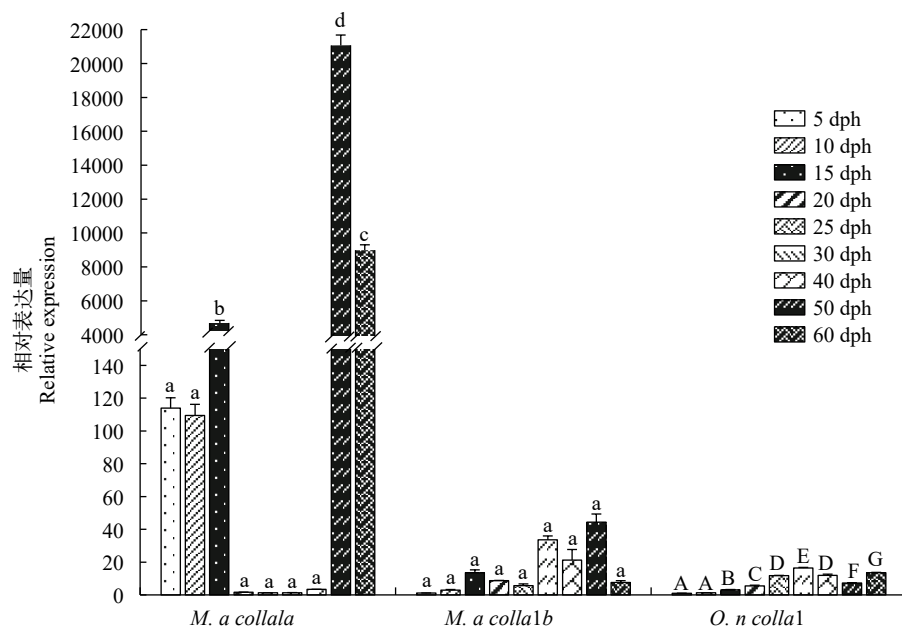


图4 *colla1*在团头鲂和罗非鱼不同发育阶段中的表达

Fig. 4 Expression of *colla1* at different developmental stages of *M. amblycephala* (M. a) and *O. niloticus* (O. n)

的2个峰值出现在15和50 dph左右, 尼罗罗非鱼 *col2a1b* 表达水平的峰值出现在30—40 dph左右, 30与40 dph的表达水平无显著性差异($P>0.05$), 但与25和50 dph有极显著差异($P<0.01$)。

3 讨论

本研究对鱼类 I 型与 II 型胶原蛋白基因表达模式与鱼类肌间骨发生发育的调控相关性进行了探究。在克隆获得团头鲂 *colla1a*、*colla1b*、*colla1* 和 *col2a1b* 基因CDS序列基础上, 比较分析了胶原蛋白基因在团头鲂与尼罗罗非鱼不同部位肌肉组织和不同发育时期(5—60 dph)尾部肌肉中的表达模式, 为探究 I、II 胶原蛋白基因在鱼类肌间骨发育过程中的潜在调控作用提供了一定的理论基础。本研究系统进化分析表明, *colla1*、*colla2* 和 *col2a1* 在有刺鱼和无刺鱼都各自聚为一支, 提示这些基因与鱼类肌间骨表型形成潜在相关。研究还表明鱼类的 *colla1b* 与 *colla1a* 在进化树中明显分为2支, 鱼类的 *colla1b* 与人、鼠和鸡等高级脊椎动物的 *colla1* 更为靠近, 推测鱼类的 *colla1* 在基因复制过程中发生了功能的分化^[25], 鱼类 *colla1b* 与高等脊椎动物同

源性更高。

胶原蛋白能够引导钙盐沉积, 参与骨骼矿化^[14], 并通过其受体系统促进成骨细胞分化^[15]。胶原蛋白基因在团头鲂和尼罗罗非鱼不同组织中的表达分析结果显示, I 型与 II 型胶原蛋白基因在团头鲂背上肌肉中的表达量高于尾部, 而在罗非鱼中尾部肌肉的表达量高于背部。团头鲂 I 型胶原蛋白从背部到尾部肌肉的表达呈逐步下降趋势, 而肌间骨的生长是从尾端向头端发育^[21], 尾端肌间骨的成熟度较高, 团头鲂 I 型胶原的表达与肌间骨的发育相吻合。与团头鲂相比, 罗非鱼没有髓弓小骨和脉弓小骨^[23], I 型胶原蛋白在尾部上方肌肉中表达量最高, 可能是因为 I 型胶原对肌肉质地的重要影响^[26]。相较于尼罗罗非鱼, *col2a1b* 在团头鲂背部肌肉组织中的表达量最高, 与团头鲂 I 型胶原的表达模式相似, 推测 II 型胶原与肌间骨的生长发育有一定的相关性^[16]。不同生长阶段的表达图谱显示, 在团头鲂中, *colla1a* 和 *col2a1b* 基因在15和50 dph分别达到高峰, 且以 *colla1a* 的表达变化最为显著; 在尼罗罗非鱼中, *colla1* 的表达量在30和60 dph分别达到峰值, *col2a1b* 的表达在30 dph达到最高峰。据万世明等^[21]

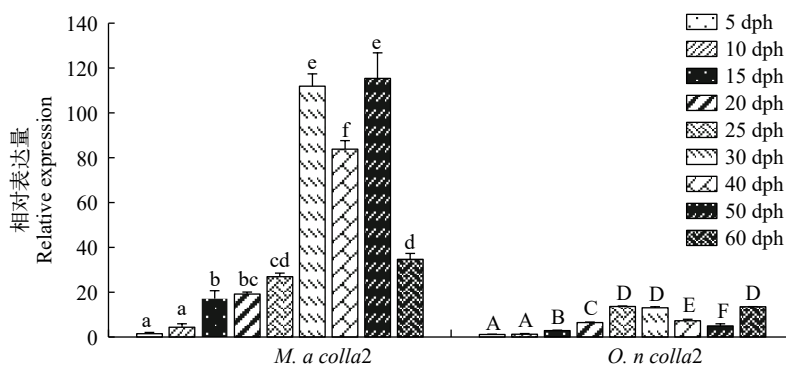


图5 *colla2*在团头鲂和罗非鱼不同发育阶段中的表达

Fig. 5 Expression of *colla2* at different developmental stages of *M. amblycephala* (*M. a*) and *O. niloticus* (*O. n*)

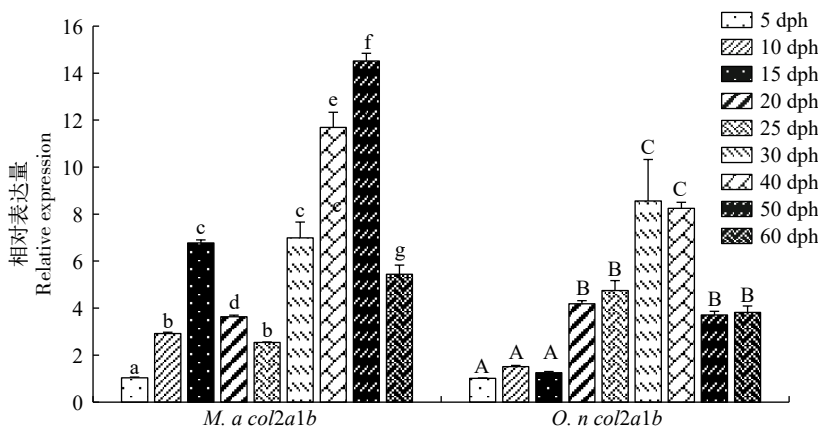


图6 *col2a1b*在团头鲂和罗非鱼不同发育阶段中的表达

Fig. 6 Expression of *col2a1b* at different developmental stages of *M. amblycephala* (*M. a*) and *O. niloticus* (*O. n*)

的观察, 团头鲂的肌间骨在20 dph左右开始萌发, 至40 dph左右基本全部出现。在本研究中团头鲂 I 型胶原蛋白在15 dph(肌间骨出现前)出现第1次表达峰值, 可能是因为骨骼矿化需要大量的胶原补充^[13,14]; 第2次表达峰值(50 dph)出现在肌间骨完全出现后的快速生长期, 这可能是因为 I 型胶原能增强成骨细胞的成骨能力, 并在一定程度上决定骨的韧性和质量^[13-15], 所以其表达在肌间骨的成熟和固化过程中再次上调。在本研究中, 团头鲂的*colla1a*在不同发育时期的表达量差异巨大, 峰值极高, 与*colla1b*的表达水平有明显差异, 与进化树分析结果相吻合, 提示*colla1*在进化过程中发生了功能的分化^[25]; *colla1a*在15和50 dph表达丰度极高, 提示*colla1*与鱼类肌间骨发育存在潜在关联。

本研究通过肌腱和骨发育相关的 I、II 型胶原蛋白基因的CDS区克隆和同源性分析, 推测鱼类 I 型和 II 型胶原与鱼类肌间骨的表型相关。结合尼罗罗非鱼和团头鲂不同组织和不同发育时期的基因表达分析, 明确*colla1*基因的表达与鱼类肌间骨发育有一定的关系, 为肌腱发育形成肌间骨提供了一定的理论支持。

参考文献:

- [1] Xie C X. Ichthyology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 56-57, 67-68. [谢从新. 鱼类学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 56-57, 67-68.]
- [2] Nie C H, Hilsdorf A W S, Wan S M, *et al.* Understanding the development of intermuscular bones in teleost: status and future directions for aquaculture [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, **12**(2): 759-772.
- [3] Patterson C, Johnson G D. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes [J]. *Smithsonian Contribution to Zoology*, 1995(559): 1-85.
- [4] Lú Y P, Bao B L, Jiang Y, *et al.* Comparative analysis of intermuscular bones in lower teleosts [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(5): 661-668. [吕耀平, 鲍宝龙, 蒋燕, 等. 低等真骨鱼类肌间骨的比较分析 [J]. 水产学报, 2007, **31**(5): 661-668.]
- [5] Nelson J S. Fishes of the world [J]. *Quarterly Review of Biology*, 1976, **7**(1995): 1-16.
- [6] Bing Z. On the myoseptal spines of the carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Current Zoology*, 1962, **14**(2): 175-178. [秉志. 幼鲤大侧肌隔骨针的观察 [J]. 动物学报, 1962, **14**(2): 175-178.]
- [7] Wan S M, Xiong X M, Tomljanovic T, *et al.* Identification and mapping of SNPs associated with number of intermuscular bone in blunt snout bream [J]. *Aquaculture*, 2019(507): 75-82.
- [8] Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Identification of MicroRNA for intermuscular bone development in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(5): 10686-10703.
- [9] Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 31050.
- [10] Chen Y L, Zhang L H, Zhou J J, *et al.* Cloning and expression analysis of *tnmd/xirp2a* genes relating to tendon development in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, **38**(2): 1-8. [陈宇龙, 张丽红, 周佳佳, 等. 团头鲂肌腱发育相关基因 *tnmd/xirp2a* 的克隆和表达 [J]. 华中农业大学学报, 2019, **38**(2): 1-8.]
- [11] Nie C H, Wan S M, Liu Y L, *et al.* Development of teleost intermuscular bones undergoing intramembranous ossification based on histological-transcriptomic-proteomic data [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(19): 4698.
- [12] Zhang W Z, Lan T, Nie C H, *et al.* Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream [J]. *Gene*, 2018(642): 116-124.
- [13] Liebschner M A K. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone [J]. *Biomaterials*, 2004, **25**(9): 1697-1714.
- [14] Jing L, Qi L, Xu H, *et al.* Effects of fluoride on the expression of collagen type I of fibroblasts and the formation of mineralized nodule in fibroblast [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2007, **26**(4): 387-389. [井玲, 齐玲, 徐辉, 等. 氟对成纤维细胞 I 型胶原表达和成骨结节形成的影响 [J]. 中国地方病学杂志, 2007, **26**(4): 387-389.]
- [15] Yang Z M, Yu X J, Qu Y, *et al.* The modulation of type I collagen and its receptor system on biological characteristics of osteoblasts [J]. *Journal of West China Medical University*, 2000(3): 281-284. [杨志明, 余希杰, 屈艺, 等. I 型胶原-整合素 $\alpha 2\beta 1$ 系统对成骨细胞生物学特性的调控 [J]. 华西医科大学学报, 2000(3): 281-284.]
- [16] Zhang X L, Qu J P, Ren L H. The research progress in bone-cartilage dysplasia disease caused by COL2A1 gene mutations [J]. *International Journal of Genetics*, 2012, **35**(2): 119-124. [张雪莲, 曲建平, 任立红. COL2A1基因突变致骨骼-软骨发育疾病研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2012, **35**(2): 119-124.]
- [17] Riera-Heredia N, Vélez E J, Gutiérrez J, *et al.* Gene expression analyses in malformed skeletal structures of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, **42**(8): 1169-1180.
- [18] Renn J, Winkler C. Characterization of collagen type 10a1 and osteocalcin in early and mature osteoblasts during skeleton formation in medaka [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, **26**(2): 196-201.
- [19] Gistelinc C, Kwon R Y, Malfait F, *et al.* Zebrafish type I collagen mutants faithfully recapitulate human type I collagenopathies [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, **115**(34): E8037-E8046.

- [20] Wang W M. Status of blunt snout bream breeding industry [J]. *Scientific Fish Farming*, 2009(4): 44-45. [王卫民. 团头鲂养殖产业现状 [J]. 科学养鱼, 2009(4): 44-45.]
- [21] Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(6): 1143-1151. [万世明, 易少奎, 仲嘉, 等. 团头鲂肌间骨发育的形态学观察 [J]. 水生生物学报, 2014, **38**(6): 1143-1151.]
- [22] Xie Q L, Yang F, Xu D J. Tilapia farming technology [J]. *Jilin Agriculture*, 2016(18): 91. [谢勤莉, 杨辅, 徐德静. 罗非鱼养殖技术 [J]. 吉林农业, 2016(18): 91.]
- [23] Su S, Dong Z. Comparative expression analyses of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) expressions in muscles of tilapia and common carp indicate that BMP4 plays a role in the intermuscular bone distribution in a dose-dependent manner [J]. *Gene Expression Patterns*, 2018(27): 106.
- [24] Liu H, Chen C, Gao Z, *et al.* The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet [J]. *GigaScience*, 2017, **6**(7): 1-13.
- [25] Gansner J M, Mendelsohn B A, Hultman K A, *et al.* Essential role of lysyl oxidases in notochord development [J]. *Developmental Biology*, 2007, **307**(2): 202-213.
- [26] Nagamalleswari D, Joseph K T. Characterization of the skin collagen of a surface water fish *Scomberoides commersonianus* [J]. *Biochemistry international*, 1991, **24**(6): 1063-1073.

PHYLOGENY AND COMPARATIVE EXPRESSION ANALYSIS OF TYPE I AND TYPE II COLLAGEN GENES IN THE REPRESENTATIVE FISH SPECIES WITH AND WITHOUT INTERMUSCULAR BONES

LIAO Qing^{1,2}, WAN Shi-Ming^{1,2}, WANG Xu-Dong^{1,2} and GAO Ze-Xia^{1,2,3}

(1. Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China; 3. Hubei Province Famous Fish Breeding and Healthy Aquaculture Engineering Technology Research Center, Wuhan 430070, China)

Abstract: Intermuscular bone (IB) is a type of membrane bone that derive from the continuous homogeneous ossification of the connective tissue in fish muscle. Collagen genes involved in the regulation of vertebrate bone mineralization, but it is not clear whether its expression is related to the development of fish intermuscular bones. In order to study the correlation among collagen genes and IB formation, this study first analyzed the phylogenetic evolution of type I and II collagen genes in fish; then compared genes expression levels at different stages and tissues between *Megalobrama amblycephala* with intermuscular bones and *Oreochromis niloticus* without intermuscular bones. Phylogenetic analysis of the collagen genes *colla1*, *colla2* and *col2a1* showed that fish species with IB and species without IB were clustered into different branches, and the amino acid homology of *M. amblycephala* and *O. niloticus* genes was less than 90%. There were significant differences between the expression levels of *colla1a* and *colla1b* genes in *M. amblycephala* and homologous genes *colla1* in *O. niloticus* in several muscle (dorsal, upper caudal and lower caudal muscles). In *M. amblycephala*, the expression levels of type I and type II collagen genes in the dorsal muscle were higher than those in the caudal muscle; however, in *O. niloticus*, the expression of these genes was opposite to that of *M. amblycephala*. The expression of *colla1a* and *col2a1b* genes of *M. amblycephala* increased significantly before the appearance of intermuscular bones (15 dph) and after the appearance of all intermuscular bones (50 dph). The relative expression of type I collagen gene and *col2a1b* were significantly different in different periods, and the expression abundance of *colla1a* at 50 dph was extremely high. Compared with *M. amblycephala*, the expression change of these genes in *Oreochromis niloticus* were small, and the overall fluctuation was not large. These results revealed that the expression level and pattern of *colla1* in two species were significantly different ($P < 0.01$), therefore we speculate that *colla1* is potentially related to the development of IB.

Key words: Intermuscular bone; *Megalobrama amblycephala*; *Oreochromis niloticus*; Collagen genes; Genetic evolution; Expression analysis